Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 4, Oct- Nov 2018, p. 533-541

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 4، مهر- آبان 1397، ص. 541-533

ارزیابی فعالیت ضد: کپکی رنگ طبیعی آناتو در شرایط آزمایشگاهی

سمانه رضایی بروجردی[1]- محمدباقر حبیبی نجفی[2]*- فرشته حسینی[3]- رضا کاراژیان[3]

تاریخ دریافت: 1396/02/25
تاریخ پذیرش: 1396/06/29

چکیده

آناتو یک رنگ مجاز طبیعی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، پتانسیل بالای درمانی و اثرات ضدمیکروبی است. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت ضدکپکی رنگ آناتو بر 3 کپک بیماری‌زا و عامل فساد غذایی مهم *آسپرژیلوس نایجر*، *نوروسپورا سیتوفیلا* و *رایزوپوس استولونیفر* است. در این پژوهش رنگ آناتو توسط روش خیساندن استخراج و پس از فیلتراسیون با آون تحت خلاء به‌صورت پودر در آورده شد. ارزیابی اولیه فعالیت ضدکپکی با روش‌های انتشار چاهک و دیسک در غلظت‌های سریالی1 تا 10 درصد عصاره استنی آناتو انجام شد و میزان حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) با روش رقت آگار در زمان‌های 48 و 72 ساعت پس از کشت تعیین گردید. قطر هاله عدم رشد در روش چاهک، در تمامی غلظت‌های عصاره برای کپک *آسپرژیلوس نایجر* بالاترین میزان محاسبه شد و بیشترین حساسیت نسبت به عصاره آناتو به‌ترتیب در کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *نوروسپورا سیتوفیلا* و *رایزوپوس استولونیفر* مشاهده گردید. روش دیسک برای بازدارندگی رنگ آناتو از رشد کپکی ناکارآمد ارزیابی شد. حداقل غلظت رنگ آناتو بازدارنده از رشد در دو سویه *آسپرژیلوس نایجر و نوروسپورا سیتوفیلا* 6 درصد و در مورد *رایزوپوس استولونیفر* 7 درصد تعیین شد. طبق یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت رنگ آناتو برای بازدارندگی رشد3 سویه کپکی ذکر شده موثر واقع شده، لذا می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب عملگر و ممانعت‌کننده رشد کپک در فراورده‌های غذایی مستعد فساد کپکی (همانند فراورده‌های نانوایی) استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: آناتو، حداقل غلظت بازدارندگی، *آسپرژیلوس نایجر*، *نوروسپورا سیتوفیلا*، *رایزوپوس استولونیفر*

مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان به‌دلیل آگاهی از اثرات نامطلوب ایجاد حساسیت، جهش‌زایی و سرطان‌زایی افزودنی‌های سنتزی تمایل زیادی به مصرف رنگ‌های طبیعی دارند (Santos *et al*. 2014). آناتو یکی از منابع اصلی تامین‌کننده رنگ طبیعی در سراسر دنیا است و به‌دلیل قیمت ارزان و کاربری آسان در محصولات مختلف غذایی همانند فراورده‌های لبنی، مارگارین، فراورده‌های غلات، نوشیدنی‌ها، فراورده‌های ماهی و غیره کاربردهای فراوان دارد (Boschetto, *et al*. 2014; Lim, 2010; Satyanarayana, *et al*. 2003).

رنگ نارنجی- قرمز آناتو (حاصل از پریکارپ دانه) به‌دلیل باندهای دوگانه کاروتنوئیدی بیکسین و نوربیکسین است. بیکسین کاروتنوئید اصلی (حدود 80 % کل پیگمان‌ها) یک ترکیب دی‌آپوکاروتنوئیدی 25 کربنه با 9 باند دوگانه کونژوگه و دو گروه کربوکسیلیک می‌باشد. بیکسین و نوربیکسین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و دارای پتانسیل بالای ضد جهش‌زایی و ضدسرطان هستند. کاروتنوئیدها و ترکیبات فنلی موجود در دانه آناتو ترکیبات بیواکتیوی هستند که در درمان بیماری‌های التهابی، قلبی عروقی، کبدی، کلیوی، ریوی، دیابت نوع 2 و کلسترول بالا مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (Boschetto, *et al*. 2014; Lim, 2010; Giridhar, *et al*. 2014; Ezuruike, *et al*. 2014).

اثرات ضدمیکروبی عصاره بخش‌های مختلف گیاه آناتو (برگ، کپسول و...) بر طیف وسیعی از باکتری‌های پاتوژن و عوامل فساد غذایی همانند *اشریشیا کلی*،شیگلا *دیسانتری*.و نیز تعداد معدودی قارچ بررسی شده است ولی تاکنون تحقیقات چندانی در مورد پتانسیل ضدقارچی رنگ دانه آناتو صورت نگرفته است. یلمه و همکاران (1393) در دو کار جداگانه اثر بازدارندگی عصاره دانه آناتو را با غلظت‌های مختلف mg/ml 0/5، 1/5، 2/5، 3/5 و 5 روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *اشریشیاکلی*، *انتروکوکوس*

1 و 2- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
3- استادیار، گروه افزودنی‌های مواد غذایی، جهاد دانشگاهی مشهد، خراسان رضوی.
4- استادیار، گروه ایمنی و کیفیت مواد غذایی، جهاد دانشگاهی مشهد، خراسان رضوی.
(*مسئول مکاتبات: Email: habibi@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1396i0.63949

فکالیس، *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریامونوسایتوژنز*، *سالمونلا انتریتیدیس* بررسی کردند. مشخص شد باکتری *باسیلوس سوبتلیس* (با MIC، 16 mg/ml و قطر هاله عدم رشد 13/7±0/52 mm) بیشترین حساسیت و باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس* کمترین حساسیت را به عصاره آناتو دارند. Silva و همکاران (2009) با تحقیق روی عصاره‌های برگ، ریشه و ساقه آناتو نتایج زیر را ب دست آوردند: بازدارندگی عصاره برگ بر *سودوموناز آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* با MIC به‌ترتیب 0/66 mg/ml– 1/88– 3/95؛ عصاره ساقه MIC برای *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* به‌ترتیب 1/20 mg/ml- 1/53- 1/53؛ عصاره ریشه MIC برای *سودوموناز آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* به‌ترتیب 0/25 mg/ml– 0/31-3/00 به‌دست آمد. مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهند که تمامی عصاره‌های گیاهی با خاصیت ضدمیکروبی از جمله آناتو، فعالیت بازدارندگی قویتری در برابر باکتری‌ها نسبت به قارچها دارند. طبق نتایج به‌دست آمده ′9- سیس- نوربیکسین و نوربیکسین تمام ترانس مسئول خصوصیات ضدمیکروبی آناتو شناخته شده اندو پتانسیلهای ضدقارچی را بیشتر می‌توان به ترپن‌های اکسیژنه نسبت داد (Lim, 2010; Sumathi, *et al*. 2011; Skaltsaa, *et al*. 2003).

کپک *آسپرژیلوس نایجر* یک آسکومیست فیلامنتی سریع الرشد و مهمترین قارچ عامل فساد پس از برداشت و بیماری‌های گیاهی در میوه ها، سبزیجات، مغزها، دانه‌ها، غلات، چوب و داروهای گیاهی است، لذا مسبب ضایعات اقتصادی عظیمی می‌باشد. آسپرژیلوس نایجر می‌تواند تولید مایکوتوکسین‌های اکراتوکسین[1](OTA)A و فومنیسین[2]B4،B2 و B6 کند. OTA یک توکسین بالقوه موثر بر کلیه[3] است و ایجاد ناهنجاری جنینی، سرکوب سیستم ایمنی و سرطان می‌کند. فومنیسین‌ها مشکوک به ایجاد مسمومیت در انسان و حیوان و سرطان‌زایی هستند. از طرفی آسپرژیلوس نایجر به‌صورت فرصت طلب می‌تواند در انسان بیماری خطرناک ریوی آسپرژیلوسیس تهاجمی را ایجاد کند (Gautam, *et al*. 2011; Nielsen, *et al*. 2009; Soares, *et al*. 2013; Denning, 1998).

رایزوپوس استولونیفر یک زیگومیست فیلامنتی ساپروفیت و عامل اصلی فساد پوسیدگی نرم رایزوپوسی (فساد پس از برداشت) در انواع مختلف محصولات زراعی، غلات، میوه‌ها و سبزیجات از جمله سیب‌زمینی، سیب‌زمینی شیرین، خیار،گوجه‌فرنگی و... است که باعث زیان‌های اقتصادی عظیمی حین ذخیره‌سازی و نقل و انتقال مواد غذایی می‌گردد (Lennartsson, *et al*. 2014; Hernández-Lauzardo, *et al*. 2005; Tournas, 2005).

نوروسپورا (مونیلیا) سیتوفیلا یک آسکومیست فیلامنتی است که به‌عنوان کپک قرمز نان و آفت مهاجم جدی در صنایع نانوایی شناخته شده است. *نوروسپورا سیتوفیلا* به‌طور وسیعی روی تفاله نیشکر (ماده پایه‌ای در صنعت عایق‌بندی)، علوفه و زمین‌های کشاورزی یافت شده، سبب فساد میوه‌جات مختلف می‌شود. این کپک در آزمایشگاه‌های قارچشناسی به‌عنوان عامل آلوده‌کننده سایر ارگانیسم‌ها شناخته می‌شود زیرا که کونیدیای آن به حدی سبک است که به‌راحتی توسط جریان هوا منتشر می‌گردد. همچنین می‌تواند به‌عنوان یک آلرژن قوی عمل کند و سبب آسم و تورم اعصاب مخاط بینی گردد (Perkins, *et al*. 1976; Shear, *et al*. 1927; Morrow, *et al*. 1943).

با توجه به اینکه مطالعه‌ای در مورد خصوصیت ضدکپکی رنگ آناتو انجام نشده است و با توجه به اهمیت 3 سویه کپکی مذکور از نظر اقتصادی و بیماری‌زایی و همچنین دارا بودن پتانسیل ایجاد فساد در فراورده‌های غذایی همانند نان که مستعد فساد کپکی توسط این سویه‌ها هستند و مبنای تحقیق آتی ما در همین زمینه می‌باشد، هدف از این پژوهش بررسی پتانسیل ضدکپکی این رنگ بر روی سه سویه مهم *آسپرژیلوس نایجر*، *رایزوپوس استولونیفر* و *نوروسپورا اینترمدیا (سیتوفیلا)* در شرایط آزمایشگاهی[4] در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

استخراج رنگ

دانه آناتو از شهر حیدر آباد هند تهیه گردید. جهت استخراج رنگ آناتو روش Castello و همکاران (2004) با کمی تغییرات به‌کار گرفته شد. به‌منظور استخراج رنگ مقداری دانه آناتو پس از تمیز شدن با حلال آلی استن (Carlo Erba، فرانسه)کاملا مخلوط شد و به مدت 2 ساعت بر روی شیکر با سرعت 86 rpm قرار گرفت تا پریکارپ دانه کاملا جدا و رنگ استخراج شود. عصاره حاصل توسط کاغذ صافی (واتمن شماره1) فیلتر گردید. سپس عصاره‌های رنگی حاصل به وسیله اواپراتور چرخان(Heidolph، آلمان) تغلیظ شد و بعد از آن توسط آون تحت خلاء(Binder، آلمان)در دمای 40°C تا دستیابی به پودر، خشک گردید. دمای 40°C به این دلیل انتخاب شد تا از تخریب حرارتی باندهای دو گانه کنژوگه رنگ جلوگیری شود. در مرحله بعد پودر حاصله در حلال آلی هگزان به‌منظور چربی‌زدایی خیسانده شد و به مدت 6 ساعت روی شیکر تحت هم‌زدن شدید توسط مگنت قرار گرفت و پس از ته‌نشینی سوسپانسیون حاصل، لایه

---

1 Ochratoxin A

2 Fumonisin

3 Nephrotoxin

4 *in vitro*

بالایی محتوی چربی و ناخالصی‌ها جداسازی شد. باقیمانده حاصل مجددا در آون تحت خلاء خشک گردیده، رنگ خالص آناتو استحصال شد و بازده آن توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

(1) 100×(وزن رنگ حاصل/وزن دانه آناتو اولیه)=درصد بازده رنگ استخراجی

آماده‌سازی عصاره استریل رنگ آناتو

به‌منظور تهیه عصاره استنی رنگ آناتو، مقدار مناسب رنگ در حلال استن حل گردید تا استوک غلیظ 35 درصد تهیه گردد. این محلول با میکرو فیلتر قطر 0/45 میکرومتر (MS ® CA)[1] استریل گردید. سایر غلظت‌های مختلف مورد نیاز آزمایشات بعدی از رقیق کردن محلول استوک استریل در حلال آلی استون به‌دست آمدند.

سوش‌های کپکی و محیط کشت مورد نیاز

سوشهای *آسپرژیلوس نایجر* 5010 (ATCC 9142) و *نوروسپورا اینترمدیا* (*سیتوفیلا*)(ATCC 9276) 5291 به‌صورت لیوفیلیزه از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد. سوش *رایزوپوس استولونیفر* DSM2194 به‌صورت کشت فعال شیب‌دار از گروه بیولوژی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان تهیه گردید. سوش‌های لیوفیلیزه ابتدا در محیط کشت PDB[2] (Scharlau، اسپانیا) تلقیح شد و سپس در محیط کشت PDA[3] (Merc، آلمان) به‌صورت سطحی کشت داده شد و در انکوباتور 25°C به مدت 3 روز گرمخانه‌گذاری و بعد تا زمان مصرف در دمای 4°C یخچال ذخیره شد و هر ماه یک کشت فرعی از آنها تهیه گردید.

تهیه سوسپانسیون اسپور

قارچ‌ها روی محیط کشت شیب‌دار PDA به مدت 3 روز در 25°C کشت داده شدند تا مرحله اسپورزایی اتفاق افتاد. اسپور از سطح محیط کشت شیب‌دار توسط افزودن محلول رینگر استریل همراه با همزدن شدید برداشت شد. تعداد اسپور قارچی توسط لام هموسایتومتر (HBG، آلمان) اندازه‌گیری گردید. سوسپانسیون به میزان 10^3 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد (Irobi, *et al*. 1996).

آزمون حساسیت[4] ضد کپکی

روش‌های انتشار چاهک آگار و انتشار دیسک روش‌هایی هستند که برای غربالگری اولیه فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌کار گرفته می‌شوند (شهنیا و همکاران،1391). برای ارزیابی حساسیت ضدکپکی عصاره آناتو بر علیه 3 سوش مورد نظر، روش‌های انتشار چاهک آگار و انتشار دیسک با تغییرات به‌کار گرفته شد (Yang, *et al*. 2010). پلیت‌های کشت یافته با تلقیح به‌صورت کشت چمنی (در 3 جهت مختلف) توسط سوآپ استریل از سوسپانسیون‌های 10^3 اسپور در میلی‌لیتر از 3 سویه کپکی *آسپرژیلوس نایجر*، *نوروسپورا سیتوفیلا* و *رایزوپوس استولونیفر* در محیط کشت PDA تهیه شد.

برای روش انتشار چاهک در هر پلیت دو چاهک به قطر 8mm با فواصل معین از طرفین پلیت در سطح محیط کشت جامد حفر گردید. رقت‌های سریالی 1 تا 10 درصد از عصاره استنی آناتو تهیه، به میزان 100 µl درون چاهک‌ها ریخته، اجازه داده شد تا به مدت یک ساعت قبل از انکوباسیون در دمای اتاق نمونه‌ها داخل آگار نفوذ کنند. در پلیت تلقیح شده دیگری درون یک چاهک (به‌دلیل منطقه بازدارندگی زیاد و تداخل با یکدیگر) 100µl محلول فنل10 درصد (Sigma Aldrich، آلمان) ریخته و به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت حاوی محیط کشت PDA به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس پلیت‌ها در دمای 25°C به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. برای روش انتشار دیسک کاغذی دیسک‌های استریل آنتی‌بیوگرام به قطر 6 mm در عصاره‌های با غلظت‌های آزمون قبل خیسانده، اجازه داده شد تا خشک شوند و سپس با فواصل معین در سطح پلیت‌های تلقیح شده به روش کشت چمنی به میزان 10^3 اسپور در میلی‌لیتر قرار گرفتند و در دمای 25°C به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از آن میانگین قطر محدوده بازدارندگی اطراف چاهک‌ها و دیسک با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)[5]

حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آناتو از رشد سویه‌های کپکی با روش رقت اگار[6] تعیین گردید (Alizadeh-Salteh, *et al*. 2010)، به این ترتیب که مقادیر مختلف از عصاره استنی آناتو به محیط کشت PDA که هنوز گرم بود (حدود 40°C تا 45)تا رسیدن به غلظت‌های نهایی 1 تا 10درصد افزوده گردید و سپس داخل پلیت (8 cm) ریخته شد. پلیت‌های حاوی 1 تا10 درصد استن به اضافه PDA به‌عنوان کنترل حلال، پلیت‌های تلقیح شده به روش کشت چمنی به میزان 10^3 اسپور در میلی‌لیتر فاقد عصاره به‌عنوان کنترل مثبت رشد کپکی و پلیت حاوی محیط کشت PDA به تنهایی به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس پلیت‌ها در دمای 25°C گرمخانه‌گذاری شد و

1 Membrane Solutions CA Syringe Filter
2 Potato Dextrose Broth
3 Potato Dextrose Agar
4 Susceptibility
5 Minimum Inhibitory Concentration
6 Agar dilution

جهت تعیین نقطه پایانی MIC بعد از مدت 48 و 72 ساعت قرائت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمون‌ها حداقل در 3 تکرار مستقل و در روزهای مختلف انجام پذیرفت. داده‌های مرتبط با میانگین‌های قطر هاله عدم رشد کپکی بر پایه طرح کاملا تصادفی توسط آنالیز واریانس ANOVA و نرم‌افزار SPSS 16.0 مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن در P≤0/05 انجام شد.

نتایج و بحث

محاسبه بازده استخراج رنگ

درصد بازده استخراج با استفاده از فرمول به میزان 3/33 به‌دست آمد.

آزمون حساسیت ضد کپکی

روش‌های انتشار چاهک آگار و انتشار دیسک روش‌هایی هستند که برای غربالگری اولیه فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌کار گرفته می‌شوند (شهنیا و همکاران،1391).

نتایج آزمون انتشار چاهک و میانگین قطر محدوده بازدارندگی اطراف چاهک‌ها در جدول 1 آورده شده است. طبق نتایج حاصل کمترین میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت 1 درصد با میانگین قطر 9/42 mm، 8/33 mm و 8/25 mm به‌ترتیب برای کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *نوروسپورا سیتوفیلا* و *رایزوپوس استولونیفر* بوده است. بیشترین میانگین قطر هاله در غلظت 10 درصد نیز با مقادیر 20/9 mm، 16/25 mm و 15/67 mm به‌ترتیب برای کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *نوروسپورا سیتوفیلا* و *رایزوپوس استولونیفر* می‌باشد. میانگین قطر مربوط به محلول فنل 36/58 mm، 29/83 mm و 27/5 mm به‌ترتیب برای کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *نوروسپورا سیتوفیلا* و *رایزوپوس استولونیفر* به‌دست آمد و در غلظت‌های زیر 1 درصد هیچ نوع اثر بازدارندگی مشاهده نگردید. همانطوریکه از بیشترین و کمترین میانگین قطر هاله‌های عدم رشد کپکی مشخص می‌شود می‌توان نتیجه گرفت که عصاره آناتو روی کپک *آسپرژیلوس نایجر* بیشترین تاثیر بازدارندگی را داشته است و کمترین اثر در مورد *رایزوپوس استولونیفر* بوده است (شکل 1) که به دلیل حساسیت کمتر در برابر عصاره آناتو و سریع الرشد بودن *نوروسپورا سیتوفیلا* و *رایزوپوس استولونیفر* نسبت به *آسپرژیلوس نایجر* می‌باشد.

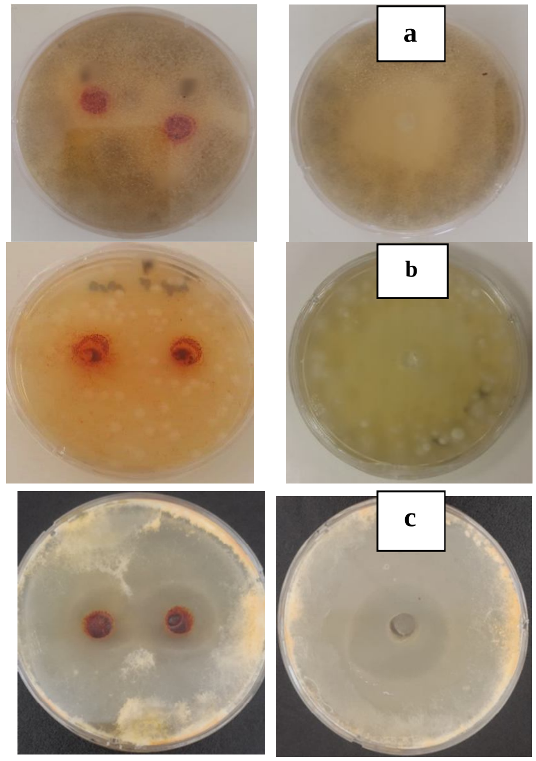
جدول 1- میانگین قطر هاله عدم رشد کپک اطراف چاهکها حاصل از عصاره آناتو (mm)

غلظت عصاره آناتو (%)	آسپرژیلوس نایجر	نوروسپورا سیتوفیلا	رایزوپوس استولونیفر
1>		-	
1	$9/42±0/95^{i}$	$8/33±0/58^{f}$	$8/25±0/0^{e}$
2	$12/25±0/66^{h}$	$10/08±0/14^{e}$	$8/83±0/38^{e}$
3	$13±2/46^{gh}$	$10/33±0/14^{e}$	$9/7±0/61^{de}$
4	$14/58± 2/58^{fg}$	$10/92±0/14^{de}$	$9/82±0/41^{de}$
5	$15/17±0/38^{efg}$	$11/02±0/47^{de}$	$10/25±0/5^{de}$
6	$15/71± 0/83^{def}$	$12/08±0/88^{d}$	$11±0/0^{cde}$
7	$17/17±0/76^{cde}$	$12/33±0/58^{d}$	$12/25±1/8^{cd}$
8	$17/5±0/0^{cd}$	$14/25±0/5^{c}$	$13/42±0/76^{bc}$
9	$18/67±0/52^{c}$	$14/42±0/38^{c}$	$15/58±1/13^{b}$
10	$20/9± 0/17^{b}$	$16/25±1/56^{b}$	$15/67±3/82^{b}$
محلول فنل 10%(w/v)	$36/58± 1/75^{a}$	$29/83±2/02^{a}$	$27/5±1/8^{a}$

حروف غیریکسان هر ستون حاکی از اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌ها (P<0/05) و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های عصاره رنگ آناتو بر عدم رشد کپک است.

-: عدم تشکیل هاله بازدارنده رشد

اعداد جدول میانگین حداقل 3 تکرار± انحراف معیار می‌باشند.



شکل 1- قطر هاله بازدارنده از رشد کپک *رایزوپوس استولونیفر* (سمت چپ) و محلول فنل 10 درصد (سمت راست) a ، کپک *آسپرژیلوس نایجر* (سمت چپ) و محلول فنل 10 درصد (سمت راست) b ، کپک *نوروسپورا سیتوفیلا* (سمت چپ) و محلول فنل 10 درصد (سمت راست) c .

طبق نتایج بین میانگین قطر هاله‌های بازدارندگی هر سه کپک در 10 غلظت مورد بررسی و قطر بازدارندگی مربوط به محلول فنل 10 درصد به‌عنوان یک ترکیب قارچ‌کش اختلاف بسیار معنی‌داری (P<0/01) وجود دارد. این نتایج با معدود یافته‌های سایر محققین که در زمینه فعالیت ضدقارچی عصاره‌های بخش‌های مختلف گیاه آناتو (برگ و..) بررسی نموده‌اند و فعالیت بازدارندگی چندان قوی را زیر غلظت‌های 1 درصد ارزیابی نکرده‌اند، هماهنگ است (اکثر مطالعات موجود روی آناتو در مورد فعالیت ضدباکتریایی آن و نیز روی عصاره سایر بخش‌های گیاه به‌جز دانه متمرکز است). طبق پژوهش انجام شده توسط Irobi و همکاران (1996) عصاره آلی برگ آناتو (غلظت 5 mg/ml) بر باکتری‌های گرم مثبت موثر ولی بر گرم منفی‌ها ،*کاندیدا یوتیلیس* و *آسپرژیلوس نایجر* (هاله عدم رشد 3 mm) اثر کمی نشان داد. با این حال با توجه به تفکیک میکروارگانیسم‌ها به محدوده‌های مقاوم و حساس توسط همین پژوهشگر می‌توان نتیجه گرفت فعالیت رنگ آناتو در غلظت‌های 1 تا 10 درصد که در مطالعه حاضر انجام شده است بر بازدارندگی رشد کپکی کاملا موثر است و سه سویه کپکی مورد بحث ما در این محدوده غلظتی نسبت به رنگ آناتو حساس ارزیابی می‌شوند. مقایسه میانگین قطر هاله‌های عدم رشد سه کپک حاصل از غلظت‌های 1 تا 10 درصدی رنگ آناتو نشان داد که در *آسپرژیلوس نایجر* بین میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های 5، 6 و 7 درصدی رنگ آناتو اختلاف معنی‌داری از جهت بازدارندگی کپکی وجود ندارد. در مورد *نوروسپورا سیتوفیلا* نیز بین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های 4، 5، 6 و 7 درصدی رنگ آناتو تفاوت معنی‌دار نیست. همچنین در کپک *رایزوپوس استولونیفر* برای میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های 3 تا 7 درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید که دلایل این یافته‌ها نیاز به مطالعات بیشتر در پژوهش‌های آتی دارد. تصویر قطر هاله عدم رشد مقاوم‌ترین سویه کپکی (*رایزوپوس استولونیفر*) در شکل 1 آورده شده است.

در آزمون انتشار دیسک در هیچ یک از غلظت‌های مورد بررسی هیچ هاله بازدارنده رشدی مشاهده نگردید. این یافته می‌تواند کارایی موثر روش چاهک را در مهار فعالیت کپکی نسبت به روش دیسک نشان دهد و دلیل آن را می‌توان به نفوذ بهتر عصاره در محیط کشت در روش چاهک و ناکارآمدی روش دیسک برای جذب کافی عصاره و انتشار آن درون محیط کشت نسبت داد. این نتیجه با یافته درسنکی و همکاران (1389) در بررسی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک و عدم حساسیت کافی روش دیسک برای مهار رشد چند باکتری بیماری‌زا همخوانی دارد. همچنین صالحی و همکاران (1390)

نیز نفوذ بهتر عصاره گیاهی پوست پسته را در روش چاهک نسبت به روش دیسک تایید کرده‌اند.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

MIC به‌عنوان کمترین غلظتی که در آن هیچ کلنی قابل مشاهده‌ای در محیط کشت وجود نداشته باشد و به‌طور کامل از رشد میکروارگانیسم ممانعت بنماید، در نظر گرفته می‌شود (Therese, *et al.* 2006). تعیین حداقل غلظت بازدارندگی با روش رقت آگار یک روش تشخیصی آزمایشگاهی مهم است چرا که به تایید میزان مقاومت میکروارگانیسم در برابر ترکیبات ضدمیکروبی کمک می‌کند و همچنین فعالیت ترکیبات ضدمیکروبی جدید را پایش می‌نماید (Sen, *et al.* 2012). تعیین نقطه پایانی قرائت MIC در کارهای تحقیقاتی مختلف موضوعی مورد بحث فراوان است و برخی محققان نقطه پایانMIC را در مورد قارچ های فیلامنتی 48 ساعت (Therese, *et al.* 2006; Rodriguez-Tudela, *et al.* 2007; Garcıa, *et al*, 2003) و برخی دیگر 72 ساعت پس از کشت (Skaltsaa, *et al.* 2003; Oliveira Junior, *et al.* 2012) در دمای مناسب در نظر گرفته‌اند. لذا در مطالعه حاضر بررسی روی غلظت‌های 1 تا 10 درصدی و نیزغلظت‌های زیر یک درصد رنگ آناتو انجام گرفت و نقطه پایان قرائت MIC در هر دو زمان 48 و 72 ساعت پس از کشت در دمای 25°C در نظر گرفته شد و نتایج با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج در جدول 2 به شرح ذیل می‌باشد.

جدول 2- مقادیرMIC رنگ آناتو بر حسب درصد بر رشد کپکی

کپک	حداقل غلظت بازدارنده عصاره آناتو از رشد کپکی (%)	
	بعد از زمان 48 ساعت	بعد از زمان 72 ساعت
آسپرژیلوس نایجر	3	6
نوروسپورا سیتوفیلا	3	6
رایزوپوس استولونیفر	6	7

همانطوریکه نتایج جدول 2 نشان می‌دهد MIC هر سه کپک در زمان‌های 48 و 72 ساعت پس از کشت با هم متفاوتند. با مقایسه سه سوش کپکی کمترین نتایج MIC 48 و 72 ساعت پس از انکوباسیون با مقادیر به‌ترتیب 3 و 3 درصد بعد از 48 ساعت و 6 و 6 درصد بعد از 72 ساعت مربوط به کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *نوروسپورا سیتوفیلا* تعیین گردید. همچنین نتایج نشان می‌دهد که کپک *رایزوپوس استولونیفر* با MIC 6 و 7 درصد به‌ترتیب در زمان‌های 48 و 72 ساعت، نسبت به دو سوش کپکی دیگر مقاومت بالاتری در برابر عصاره دانه آناتو دارد و کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *نوروسپورا* حساسیت مشابه و بیشتری نسبت به عصاره نشان داده‌اند. در نمونه‌های کنترل حلال (استن) پلیت‌های حاوی سوش‌های کپکی در غلظت‌هایی که به‌عنوان MIC در نظر گرفته شده‌اند، رشد منفی و یا ناچیزی مشاهده گردید. بدان معنی که حلال آلی استون اثر بازدارندگی بر رشد کپک نداشته است. همچنین در غلظت‌های کمتر از 1 درصد بعد از سپری شدن 48 ساعت از انکوباسیون رشد زیادی در سطح پلیت‌ها در 3 سویه کپکی مشاهده شد و این نتیجه در جهت تایید نتایج آزمون انتشار چاهک و قطر هاله عدم رشد می باشد. از طرفی رشد در سطح پلیت‌های 1 تا 3 درصد کمتر از پلیت‌های کنترل ارزیابی گردید که نشان‌دهنده بازدارندگی نسبی رشد کپکی توسط رنگ آناتو در این محدوده غلظتی می‌باشد. نتایج این تحقیق با یافته‌های Irobi و همکاران (1996) که روی عصاره آلی برگ آناتو (غلظت 5 mg/ml) بررسی نموده، فعالیت ضدقارچی را بر چند سویه قارچی از جمله *آسپرژیلوس نایجر* در آن محدوده غلظتی کم ارزیابی کرده بودند همخوانی دارد چرا که رنگ آناتو در غلظت‌های زیر 1 درصد بعد از 48 ساعت هیچ فعالیت ضدکپکی موثری در مورد 3 سویه کپکی در مطالعه حاضر نشان نداد. Galindo و همکاران (2003) نیز طی بررسی خود دریافتند عصاره تجاری آناتو بر رشد *باسیلوس سرئوس*، *کلستریدیوم پرفرینجنس* و *استافیلوکوکس اورئوس*اثر بازدارندگی نشان می‌دهد و هیچ فعالیتی ضدمخمرها و باکتری‌های گرم منفی دیده نشد. از طرفی گارسیا و همکاران (2003) نیز در بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آلی برگ و ساقه آناتو (غلظت کمتر از (v/v) 2%) روی *آسپرژیلوس نایجر*، MIC آن را بیش از 8 mg/ml تعیین کردند. همگی این یافته‌ها نشان می‌دهند فعالیت ضدکپکی آناتو در غلظت‌های پایین (به‌خصوص غلظت کمتر از 1 درصد با توجه به نتایج MIC و قطر هاله عدم رشد، هر دو) ناچیز و در جهت تایید نتایج مطالعه ما است. با توجه به اینکه نتایج متفاوتی در زمان‌های 48 و 72 ساعت بعد از کشت به‌دست آمده‌اند، تعیین نقطه پایانی قرائت MIC 72 ساعت پس از کشت در نظر گرفته می‌شود تا نتایج منفی کاذبی که حداقل غلظت بازدارندگی تعیین شده طی مدت 48 ساعت را غیرقابل اعتماد می‌سازند، حذف گردد. با این حال برای ارزیابی دقیق‌تر محدوده غلظتی موثر عصاره بر بازدارندگی رشد کپکی مطالعات بیشتر به‌خصوص در سیستم‌های مدل غذایی (همانند فراورده‌های نانوایی که مستعد فساد توسط این 3 سویه کپکی هستند) پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات نـامطلوب اسـتفاده از افزودنـی‌هـای سـنتزی و افزایش تقاضای جهانی جهت استفاده از انـواع طبیعـی آنهـا، امـروزه رنگ آناتو به‌عنوان یک رنگ طبیعی در بیشتر فـراورده‌هـای غـذایی کاربرد فزاینده‌ای دارد. با عنایت به نتایج مطالعه حاضر که نشـان داد این رنگ با MIC 6 تـا 7 درصـد (دارای اثـر بازدارنـدگی نسـبی در محدوده غلظتی زیر 6 درصد) می‌تواند ممانعت‌کننده رشد 3 سویه مهم از کپک‌های بیماری‌زا و عامل فساد بسیاری از فـراورده‌هـای غـذایی باشد و با توجه به پتانسیل‌های فراوان درمانی و عملگـری ترکیبـات بیواکتیو موجـود در دانـه آنـاتو، اسـتفاده از ایـن رنگدانـه طبیعـی در فراورده‌های رنگی که جهت افزایش بازار پسندی نیاز به سطوح بالای کاربرد رنگ دارند (همانند فراورده‌های غلات) می‌تواند تـامین‌کننـده بخش مهمی از نیاز بازار مصرف فراورده‌های غذایی سلامتی‌بخش در جامعه باشد. اثرات بازدارندگی رنگ آناتو بر فعالیـت 3 سـویه کپکـی مورد مطالعه که از عوامل اصلی در فساد نان محسوب می‌شوند و نیز تاثیر به‌کارگیری ایـن رنـگ بـر خصوصـیات ارگـانولپتیکی و حسـی محصول نهایی در دست بررسی است و متعاقبا نتایج آن منتشر خواهد شد.

منابع

Alizadeh-Salteh, S., Arzani, K., Omidbeigi, R., Safaie, N., 2010, Essential Oils Inhibit Mycelial Growth of *Rhizopus stolonifer*, *Europ.J.Hort.Sci*. 75(6), 278–282.

Boschetto, D.L., Aranha, E.M., Ulson de Souza, A.A., Guelli U. Souza, S.M.A., Ferreira, S. R.S., Priamo,W.L., Oliveira, J.V.,2014, Encapsulation of bixin in PHBV using SEDS technique and in vitro release *evaluation*, *Industrial Crops and Products*,60,22–29.

Castello, M., Chandra, N., Phatak, A., Madhuri, S., 2004, Estimation of bixin in seeds of *Bixa* orellana L. from different locations inwestern Maharashtra, Indian J. Plant Physiol, 9(2), 185-188.

Denning, D.W., 1998, Invasive Aspergillosis, State-of-the-art clinical article, *Clinical Infectious Diseases*, 26,781 – 805.

Ezuruike, F.U., Prieto, M.J., 2014, the use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations, *Journal of Ethnopharmacology* 155(2):857-924

Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D., Rankin, S.A., 2003, Antimicrobial Properties of Commercial Annatto Extracts against Selected Pathogenic, Lactic Acid, and Spoilage Microorganisms, *Journal of Food Protection*, 6,911-1099.

Garcıa, N.V.M.,. Gonzalez, A., 2003, Fuentes M., Aviles, M., Rios M.Y., Zepeda, G., Rojas, M.G., Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 85–88.

Gautam, A.K., Sharma, S., Avasthi, S., Bhadauria, R., 2011, Diversity, phatogenecity and toxicology of *A. Niger*: An important spoilage fungi, *Research Journal of Microbiology*, 6(3), 270-280.

Giridhar, P., Venugopalan, A., Parimalan, R., 2014, A Review on Annatto Dye Extraction, Analysis and Processing – A Food Technology Perspective, *Journal of Scientific Research & Reports*, 3(2), 327-348.

Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G. Trejo-Espino, J.L., 2005, Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Fr.) Vuill. Causal Agent of Rhizopus Rot Disease of Fruits and Vegetables, *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 65-69.

Irobi, O.N., Moo-Young, M., Anderson, W.A., 1996, Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa* Orellana), *International Journal of Pharmacognosy*, 34(2)87-90.

Kazemi Dorsanki, R., Ghaemi, N., Mirpour, M.S., 2010, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from probiotic products (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*), *Journal of Microbiological Biotechnology*, Islamic Azad University, 2(7), 29-36 (in persian).

Lennartsson, PR., Taherzadeh, MJ, Edebo, L., 2014, Rhizopus, Encyclopedia of Food Microbiology, V. 3.284-290.

Lim, T.K., 2010, Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: V.1, Fruits, Bixa orellana, *Springer*, Netherlands.

Morrow, M.B., Lowe, E.P., 1943, Molds in Relation to Asthma and Vasomotor Rhinitis: A Review, *Mycologia*, 35(6), 638-653.

Nielsen, K.F., Mogense, J.M., Johansen, M. Lar sen, T.O., Frisvad, J.C.S., 2009, Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group, *Anal Bioanal Chem*,395,1225– 1242.

Oliveira Junior, E.N., El Gueddari, N.E., Moerschbacher, B.M., Franco, T.T., 2012, Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans, *Brazilian Journal of Microbiology*, 800-809.

Perkins, D.D., Turner, B.C., Barry, E.G., 1976, Strains of Neurospora Collected from Nature, *Evolution*, 30 (2), 281-313.

Rodriguez-Tudela, J.L., Alcazar-Fuoli, L., Alastruey-Izquierdo, A., Monzon, A., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M.,

2007, Time of Incubation for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus fumigatus*: Can MIC Values Be Obtained at 24 *Hours Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(12), 4502–4504.

Salehi, M., Raies nia, N., Mehrabian, S., 2011, Evaluation of the antibacterial effect of methanolic extracts of outer shell of wild pistachio (Pistacia vera, Journal of Microbiological Biotechnology, Islamic Azad University, 10 (3), 59- 53 (in persian).

Santos, L.F., Dias,V.M., Pilla,V., Andrade, A.A., Alves, L.P., Munin, E., Monteiro, V.S., Zilio, S.C.,2014, Spectroscopic and photothermal characterization of annatto: Applications in functional foods, *Dyes and Pigments*,110,72-79.

Satyanarayana, A., Prabhakara Rao, P. G., Rao, D. G.,2003, Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana L*.), *Journal of Food Science and Technology*,40(2),131-141.

Sen, A., Batra, A., 2012, Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant*: Melia Azedarach L*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4(2) , 67-73.

Shahnia M., Khaksar, R., 2013, Antimicrobial effects and methods for determining the minimum inhibitory concentration of plant essential oils on pathogenic bacteria, *Journal of Nutrition Sciences and Food Industry of Iran*, 5 (7), 955-949 (in persian).

Shear, C. L., Dodge, B.O.,1927, Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of Monilian sitophila group, *Journal of Agricultural Research*, 34(11),1019-1042.

Skaltsaa, D.H., Demetzos, C., Lazarib, D., Sokovic, M., 2003, Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece, *Phytochemistry*, 64,743–752.

Soares, C., Calado,T., Venâncio, A.,2013, Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions, *Rev Iberoam Micol*,30(1) ,9–13.

Silva, B.R., Almeida, R.C., Chavasco, M.J., Chavasco, K.J.,2009, Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilizated hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* L., *Bixaceae*, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(2),171-174.

Sumathi, P., Parvathi, A.,2011, Antibacterial potential of the aueous and organic extracts of *Bixa Orellana L*., *International Journal of Pharma and Bio Sciences*,2(2),193-201.

Therese, KL., Bagyalakshim, R., Madhavan, HN., Deepa, P.,2006, *In Vitro* susceptibility testing by agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations of Amphotericin B, Fluconazole and Ketoconazole against Ocular fungal isolates, *Indian journal of medical microbiology*,24(4),273-9.

Tournas, V. H .2005, Spoilage of Vegetable Crops by Bacteria and Fungi and Related Health Hazards, *Critical Reviews in Microbiology*, 31, 33–44.

Yang, E.J., Chang, H.C.,2010, Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi, International Journal of Food Microbiology,139,56-63.

Yolmeh, M., Habibi, N.M., Hosseini, F., Shahabadi, S.,2014, Evaluation of Antibacterial Activity of Annatto Dye on *Streptococcus Pyogenes* *Escherichia Coli*, *Enterococcus Faecalis*, and *Bacillus Subtilis*, *Sadra* Med *Sci J*., 2(3),307-314.

Yolmeh, M., Habibi, N.M., Farhoush R., Hosseini, F., 2015, Anti-bacterial effect of Anatto color on several bacterial pathogens, *Qom University of Medical Sciences Journal*, 8 (4), 57-53 (in persian).

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 4, Oct- Nov 2018, p. 533-541

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 4، مهر- آبان 1397، ص. 541-533

In vitro evaluation of anti-mold activity of annatto natural dye

S. Rezaei Boroojerdi[1], M. B. Habibi Najafi* [b], F. Hosseini[c], R. Karazhyan [d]

Received: 2017.05.15
Accepted: 2017.09.20

Introduction: Nowadays, with the increasing awareness of the side effects of synthetic additives, consumer's demand for colorants from natural sources has been increased. Annatto is an allowed natural colorant used in food industries, textiles, cosmetics and pharmaceutical products. The colorant is extracted from the seeds, which are covered by a red, resinous pericarp containing the pigments. The main pigment is bixin (methyl hydrogen 9′-cis-6, 6′-diapocarotene-6, 6′-dioate) which is responsible for the orange red color in the seeds (80% of total carotenoids). Smaller amounts of norbixin are also presented. Bioactive compounds like bixin and phenolic compounds reduce the risks of various chronic disorders, such as cancer, inflammation, cardiovascular, hypercholesterolemia, diabetes, and cataracts (Boschetto, et al., 2014; Somacal et al., 2015; Ezuruike & Prieto, 2014). Moreover many studies have proven antimicrobial activity of annatto extracts (leaves, capsules, seeds…) against several food spoilage and pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, as well as few fungi such as *Candida utilis*, and *Aspergillus niger.* Annatto is a permitted natural food coloring with antioxidant properties, high therapeutic potential and antimicrobial effects. The aim of this study was to evaluate antimold activity of annatto natural dye on 3 important food pathogenic and spoilage molds, *Aspergillus niger,Neurospora sitophila* and *Rhizopus stolonifer*.

Material and Methods: Annatto dye was extracted by maceration method and after filtration it was dried by a vacuum oven. Anti-mold activity was evaluated by well diffusion and disk diffusion methods in 1 to 10 percent concentrations of acetone extract of annatto and minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using agar dilution method at 48 and 72 h after incubation at 25 °C.

Results and Discussion: The results indicated promising anti-mold activity. The highest mean zones of inhibition in all concentrations were obtained for *Aspergillus niger*, *Neurospora sitophila* and *Rhizopus stolonifer*, respectively. This difference might be due to the more resistance and rapid growth of *Rhizopus stolonifer* and *Neurospora sitophila* compared to *Aspergillus niger*. No inhibitory effect was observed in the concentrations below than 1%, this result is in consistent with Irobi, et al., (1996) findings that proved annatto's organic extract has a weak effect on *Aspergillus niger* at low concentration (5 mg/ml).In all concentrations, *Aspergillus niger* showed the highest inhibition zone and the most sensitivity to annatto extract found at *Aspergillus niger*, *Neurospora sitophila* and *Rhizopus stolonifer*, respectively. Disk diffusion method was inefficient to inhibit mold growth. Minimum inhibitory concentration of annatto dye against *Aspergillus niger* and *Neurospora sitophila* was determined 6 percent while *Rhizopus stolonifer* showed 7 percent. According to the results annatto dye was effective to inhibit growth of *Aspergillus niger, Neurospora sitophila* and *Rhizopus stolonifer.* Therefore it can be concluded that annatto dye could be used as a functional and inhibitory agent against mold growth in the foods that are susceptible to mold spoilage (e.g. bakery goods).

Keywords: annatto, MIC, *Aspergillus niger*, *Neurospora sitophila, Rhizopus stolonifer*

1 and 2. Farmer Msc. Student and Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
3. Assistant Professor Department of Food Additives, Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Food Additives, Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad, Iran.
(Corresponding author Email: habibi@um.ac.ir)